

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-335949

(43)Date of publication of application : 26.11.2002

(51)Int.Cl.

C12N 1/00
B32B 3/12
C08J 9/28
C08L 67/00
C12M 1/00
//(C08L 67/00
C08L101:00)

(21)Application number : 2001-152379

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES

(22)Date of filing : 22.05.2001

(72)Inventor : SHIMOMURA MASATSUGU
NISHIKAWA TAKEHIRO
ARAI KEIKO

(54) CELL THREE-DIMENSIONAL TISSUE CULTURE METHOD USING HONEYCOMB STRUCTURE FILM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To develop a culture method for forming an ordered cell three- dimensional aggregate similar to a biological tissue.

SOLUTION: This culture method for forming the cell three-dimensional aggregate is characterized by casting the hydrophobic organic solvent solution of a biodegradable and amphipathic polymer alone or a polymer mixture comprising a biodegradable polymer and an amphipathic polymer on a substrate, evaporating the organic solvent and simultaneously condensing dew on the surface of the cast liquid, evaporating fine water drops formed by the condensation of the dew to form a honeycomb structure film, and then culturing cells on the honeycomb structure film or its oriented film as a substrate for culturing the cells.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-335949

(P2002-335949A)

(43) 公開日 平成14年11月26日 (2002. 11. 26)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 1/00		C 1 2 N 1/00	F 4 B 0 2 9
B 3 2 B 3/12		B 3 2 B 3/12	A 4 B 0 6 5
C 0 8 J 9/28	CFD	C 0 8 J 9/28	CFD 4 F 0 7 4
C 0 8 L 67/00	Z B P	C 0 8 L 67/00	Z B P 4 F 1 0 0
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	C 4 J 0 0 2
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-152379(P2001-152379)

(22) 出願日 平成13年 5 月22日 (2001. 5. 22)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年 5 月 7 日
社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集 50巻第
5号」に発表

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

(72) 発明者 下村 政嗣

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内

(72) 発明者 西川 雄大

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外 3
名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハニカム構造体フィルムを用いた細胞の三次元組織培養法

(57) 【要約】

【課題】 生体組織に類似した秩序だった細胞の三次元集合体の形成を生体外で行うための培養法を開発すること。

【解決手段】 生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを細胞培養用基材として用いて細胞を培養することを特徴とする、細胞の三次元集合体を形成する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを細胞培養用基材として用いて細胞を培養することを特徴とする、細胞の三次元集合体を形成する方法。

【請求項2】 生分解性ポリマーとして脂肪族ポリエステルを使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物として、50～99w/w%の生分解性ポリマーおよび50～1w/w%の両親媒性ポリマーからなるポリマー混合物を使用する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることで該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを用いる、請求項1から3の何れかに記載の方法。

【請求項5】 疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを用いる、請求項1から3の何れかに記載の方法。

【請求項6】 ハニカム構造体フィルムの延伸フィルムを用いる、請求項1から5の何れかに記載の方法。

【請求項7】 延伸を一軸延伸、二軸延伸又は三軸延伸によって行う、請求項1から6の何れかに記載の方法。

【請求項8】 延伸方向の伸長率が1.1から10倍の範囲内である、請求項1から7の何れかに記載の方法。

【請求項9】 ハニカム構造体の直径が0.1～100μmである、請求項1から8の何れかに記載の方法。

【請求項10】 ハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムの両面上において細胞を培養することを特徴とする、請求項1から9の何れかに記載の方法。

【請求項11】 ハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムの両面上で培養される細胞が互いに異なることを特徴とする、請求項1から10の何れかに記載の方法。

【請求項12】 請求項1から11の何れかに記載の方法により調製される細胞の三次元集合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ハニカム構造体フィルムを用いた細胞の三次元組織培養法に関する。より

詳細には、本発明は、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーを用いて調製されるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを用いて細胞を培養することを特徴とする、細胞の三次元集合体を形成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 細胞と材料との相互作用において、細胞は材料表面の化学的な性質のみならず微細な形状によっても影響を受けることが知られている。そこで組織工学などの観点から細胞の機能制御を目指すとき、細胞と接触する材料表面の化学的性質と微細な構造の双方の加工が重要となる。表面の微細加工法としては、表面加工技術として半導体産業等に利用されているマイクロパターン技術を利用した細胞接着面のサイズコントロール、培養基板への微小溝構造の導入、マイクロスフィアによる微細凹凸の作製などが挙げられ、表面微細構造が細胞の成長等に大きく影響を及ぼすことが知られている。

【0003】 これらのマイクロパターン技術を使った表面設定は、非常に高度な技術が必要であり、大量生産が出来ない、高コストになる、などの多くの問題を抱えているのが現状である。全く別の表面パターンニング技術としては特殊な構造を有するポリマーの希薄溶液を高湿度下でキャストすることでμmスケールのハニカム構造を有するフィルムが得られることが知られている。本方法はパターンニングするに当たっての経済性に優れることが特徴である。

【0004】 具体的には、サイエンス、1999年、283巻、ページ373には親水性ブロックと疎水性のブロックからなるロッド-コイルジブロックポリマーであるポリフェニルキノリン-ブロック-ポリスチレンを使う例が、また、ネイチャー、1994年、369巻、ページ387にはポリスチレンと剛直なブロックであるポリパラフェニレンとからなるジブロックポリマーを使った例が開示されている。このように、従来の技術では自己凝集力の強い部分と柔軟性を発現する部分とを併せ持つ特殊なポリマーを利用し、これらのポリマーを疎水性有機溶媒に溶解し、これをキャストする事でハニカム構造体を調製していた。一方、本発明者らはシンソリッド フィルムズ、1998年、327-329巻、ページ854、スープラモレキュラーサイエンス、1998年、第5巻、ページ331、及びモレキュラー・クリスタル・リキッド・クリスタル、1998年、第322巻、ページ305に親水性のアクリルアミドポリマーを主鎖骨格とし、疎水性側鎖としてドデシル基と親水性側鎖としてラクトース基或いはカルボキシル基を併せ持つ両親媒性ポリマー、或いはヘパリンやデキストラン硫酸などのアニオン性多糖と4級の長鎖アルキルアンモニウム塩とのイオンコンプレックスが同様な方法でハニカム構造を有する薄膜を与えることを報告している。

【0005】 しかしながらこれらのポリマーでは、得られるハニカム構造体の自己自立性に劣ったり、経時的にハニカム構造が崩壊するなどの欠点を有するため、細胞

培養用基材として十分な機能を提供するものでなかった。

【0006】細胞工学、組織工学等において細胞培養を行う時、細胞の足場となる基材が必要であり、前述の如く、細胞との相互作用において細胞は最良表面の化学的な性質のみならず微細な形状によっても影響を受けることが知られている。細胞の機能制御を目指すとき、細胞と接触する材料表面の化学的性質と細胞の微細な構造の双方の設計が重要となる。ハニカム構造を有する多孔性フィルムではハニカムパターンが細胞接着面を提供し、多孔質構造が細胞の支持基盤へのアクセス、栄養の供給ルートとなることが示されている。

【0007】このハニカム構造フィルムをベースに細胞を組織化すれば、その1つの利用方法として人工臓器が考えられる。しかし人工臓器等にしたときには体内に埋め込むことが必須となる為、この基材は長期的には生体内へ吸収されることが望ましい。これまでのハニカム構造を与える材料で細胞培養に要する時間は安定に構造を維持し、それ以上では分解するような生分解性材料から作られたものはない。言い換えれば、ハニカム構造体と細胞工学、細胞培養技術を組み合わせ人工臓器等の医療用途へ展開するに当たっては生分解性材料を使うことが必須である。

【0008】このような事情に鑑み、本発明者らは、生分解性ポリマーが50～99w/w%および両親媒性ポリマーが50～1w/w%からなるポリマーの疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を徐々に蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることで得られるハニカム構造体、並びに該ハニカム構造体からなるフィルムを提案している

(特願平11-340568号明細書(本出願時点において未公開)。しかしながら、この方法で作製したハニカム構造を有するフィルムを用いて、生体組織に類似した秩序だった細胞の三次元集合体の形成することができるかどうかは不明であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生体組織に類似した秩序だった細胞の三次元集合体の形成を生体外で行うための培養法を開発することを解決すべき課題とした。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ポリ乳酸の自己支持性ハニカム構造体上で肝実質細胞を培養することにより、肝臓組織類似の三次元的細胞集合体構造を形成させることができることを見出した。また、ポリ乳酸の自己支持性ハニカム構造体上で心筋細胞の培養を行ったところ、フィルムの各面に接着した心筋細胞が多孔質構造を介して接着した三次元心筋細胞集合体が形成されるこ

とを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0011】即ち、本発明によれば、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを細胞培養用基材として用いて細胞を培養することの特徴とする、細胞の三次元集合体を形成する方法が提供される。

【0012】本発明において好ましくは、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を使用する。本発明において好ましくは、生分解性ポリマーとして脂肪族ポリエステルを使用する。本発明において好ましくは、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物として、50～99w/w%の生分解性ポリマーおよび50～1w/w%の両親媒性ポリマーからなるポリマー混合物を使用する。

【0013】本発明では、例えば、疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることで該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを用いることができ、あるいは、疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを用いることができる。

【0014】本発明では、ハニカム構造体フィルムの延伸フィルムを用いてもよく、その場合、延伸は一軸延伸、二軸延伸又は三軸延伸によって行うことができ、延伸方向の伸長率は好ましくは1.1から10倍の範囲内である。本発明において好ましくは、ハニカム構造体の直径が0.1～100μmである。本発明において好ましくは、ハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムの両面上において細胞が培養される。この場合、ハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムの両面上で培養される細胞が互いに異なってもよい。本発明の別の側面によれば、上記した本発明による方法により調製される細胞の三次元集合体が提供される。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。本発明による細胞の三次元集合体を形成する方法は、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマー又は生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーとから成るポリマー混合物の疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時

に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させることにより得られるハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを細胞培養用基材として用いて細胞を培養することの特徴とする。

【0016】本発明では、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーを使用してもよいし、あるいは、生分解性を有するポリマーと両親媒性を有するポリマーから成る複数のポリマーの混合物を使用してもよい。

【0017】本発明で用いることができる生分解性ポリマーとしては、ポリ乳酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリエチレンアジペート、ポリブチレンアジペートなどの生分解性脂肪族ポリエステル、並びにポリブチレンカーボネート、ポリエチレンカーボネート等の脂肪族ポリカーボネート等が、有機溶媒への溶解性の観点から好ましい。中でも、ポリ乳酸、ポリカプロラクトンが入手の容易さ、価格等の観点から望ましい。

【0018】本発明で用いることができる両親媒性ポリマーとしては、細胞培養基材として利用することを考慮すると毒性のないことが好ましく、ポリエチレングリコール／ポリプロピレングリコールブロック共重合体、アクリルアミドポリマーを主鎖骨格とし、疎水性側鎖としてドデシル基と親水性側鎖としてラクトース基或いはカルボキシル基を併せ持つ両親媒性ポリマー、或いはヘパリンやデキストラン硫酸、核酸（DNAやRNA）などのアニオン性高分子と長鎖アルキルアンモニウム塩とのイオンコンプレックス、ゼラチン、コラーゲン、アルブミン等の水溶性タンパク質を親水性基とした両親媒性ポリマー等を利用することが望ましい。

【0019】また、生分解性かつ両親媒性を有する単独のポリマーとしては、例えば、ポリ乳酸-ポリエチレングリコールブロック共重合体、ポリエーカプロラクトン-ポリエチレングリコールブロック共重合体、ポリリンゴ酸-ポリリンゴ酸アルキルエステルブロック共重合体などが挙げられる。

【0020】本発明で用いるハニカム構造体を作成するに当たってはポリマー溶液上に微小な水滴粒子を形成させることが必要であることから、使用する有機溶媒としては非水溶性（疎水性）であることが必要である。疎水性有機溶媒の例としてはクロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン系有機溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル類、メチルイソブチルケトンなどの非水溶性ケトン類、二硫化炭素などが挙げられる。これらの有機溶媒は単独で使用しても、又、これらの溶媒を組み合わせた混合溶媒として使用してもよい。疎水性有機溶媒に溶解する生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーの両者の合計のポリマー濃度は、好ましくは0.01から10重量%であり、より好ましくは0.05から5重量%である。ポリマー濃度が0.01重量%より低いと得られるフィルムの力学強度が不足し望ましくない。また、ポリマー濃

度が10重量%以上ではポリマー濃度が高くなりすぎ、十分なハニカム構造が得られない。

【0021】また、生分解性ポリマーと両親媒性ポリマーを使用する場合、その組成比は特に限定されないが、好ましくは99:1～50:50 (wt/wt) の範囲内である。両親媒性ポリマー比が1以下の場合には、均一なハニカム構造が得るのが困難となる場合があり、又、両親媒性ポリマー比が50以上では得られるハニカム構造体の安定性、特に力学的な安定性が低下する場合がある。

【0022】本発明においては該ポリマー有機溶媒溶液を基板上にキャストしハニカム構造体を調製する。基板としてはガラス、金属、シリコンウェハー等の無機材料、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエーテルケトン等の耐有機溶剤性に優れた高分子、水、流動パラフィン、液状ポリエーテル等の液体が使用できる。中でも、基材に水を使用した場合、該ハニカム構造体の特徴である自立性を生かすことで、該構造体を単独で容易に基板から取り出すことができ、好適である。

【0023】本発明で、ハニカム構造が形成される機構は次のように考えられる。疎水性有機溶媒が蒸発するとき、潜熱を奪う為に、キャストフィルム表面の温度が下がり、微小な水の液滴がポリマー溶液表面に凝集、付着する。ポリマー溶液中の親水性部分の働きによって水と疎水性有機溶媒の間の表面張力が減少し、このため、水微粒子が凝集して1つの塊になろうとするに際し、安定化される。溶媒が蒸発していくに伴い、ヘキサゴナルの形をした液滴が最密充填した形で並んでいき、最後に、水が飛び、ポリマーが規則正しくハニカム状に並んだ形として残る。

【0024】従って、該フィルムを調製する環境としては、(1) 疎水性有機溶媒溶液を基板上にキャストし、高湿度空気を吹き付けることで該有機溶媒を徐々に蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させる方法；並びに(2) 疎水性有機溶媒溶液を、相対湿度50～95%の大気下で基板上にキャストし、該有機溶媒を蒸散させると同時に該キャスト液表面で結露させ、該結露により生じた微小水滴を蒸発させる方法；などが好ましい。このようにしてできるハニカム構造体のひとつひとつ（個々）の大きさは、特に限定されないが、好ましくは0.1から100 μm であり、より好ましくは0.1から10 μm であり、この範囲の大きさであれば、細胞培養用の基材として好適に用いることができる。

【0025】さらに、本発明においては、上記のようにして作製したハニカム構造体フィルムをそのまま用いることに加えて、該ハニカム構造体フィルムを延伸することにより伸長した細孔の配列構造を有するフィルムを用いることもできる。このような延伸フィルム上で細胞を培養した場合、細胞が細孔の直線的な配列に沿って配向

する。

【0026】フィルム延伸の方法は、特に限定されず、例えば、ハニカム構造体フィルムの2以上の端をピンセット又は手でつまみ、伸長方向に引っ張ることにより行うことができる。あるいは、マイクロマニピレータを用いて延伸を行うこともできる。

【0027】本発明において、延伸は、一軸延伸、二軸延伸又は三軸延伸の何れでもよい。本発明における延伸の具体例の模式図を図1に示す。図1において、(a)は一軸延伸、(b)は二軸延伸、(c)は三軸延伸を示し、 α は対称軸と延伸方向のなす角を示し、 β 及び γ は延伸方向のなす角を示す。本発明において、延伸方向の伸長率は特に限定されないが、好ましくは1.1から10倍の範囲内である。伸長率が1.1倍以下では延伸による本発明の効果が小さく、また伸長率が10倍以上ではフィルムが破壊され易くなる。

【0028】本発明においては、上記のようにして作製したハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムを細胞培養用基材として用いて細胞を培養することにより、細胞の三次元集合体を形成することができる。本発明の方法で培養できる細胞の種類は特に限定されず、任意の培養細胞、並びに組織から採取した細胞などを培養することができる。以下の実施例で示される通り、本発明の方法で形成したラット肝臓由来肝実質細胞の集合体は高いアルブミン合成能を発現することができ、また本発明の方法で形成したラット胎児心臓由来心筋細胞の集合体はその拍動リズムをフィルム全体で同期させて拍動させることができる。従って、本発明の方法によれば、培養細胞から、生体内における機能を発現する3次元組織体を形成することが可能である。

【0029】本発明の好ましい態様においては、まず、ハニカム構造体フィルムの片側に細胞を播種し、フィルムへの細胞の接着を確認した後に、その反対側の面に細胞を播種し、培養を行う。培養は通常の細胞培養の条件に準じて行うことができる。即ち、本発明では、ハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムの両面上において細胞を培養することが好ましい。この場合、ハニカム構造体フィルム又はその延伸フィルムの両面上で培養される細胞は互いに同一でも異なってもよい。細胞培養に用いる培地の種類は特に限定されず、細胞の種類に応じて適当な培地（例えば、Williams' E培地、F-10培地、RPM11640培地、EagleのMEM培地、DMEM培地、またはこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等）を選択することができる。培養条件は細胞の種類に応じて適宜選択することができ、一般的にはpH6～8、温度30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で培養を行うことができる。

【0030】また、延伸フィルムを細胞培養用基材として用いる場合には、細胞の配列を制御することも可能であり、特に、心筋組織や血管組織などのように細胞の配

列構造を有する組織の再生の場合には有利である。上記したような本発明による方法により調製される細胞の三次元集合体も本発明の範囲内である。以下、本発明を実施例を使って詳細に説明するが、本発明は実施例によって何ら限定されるものではない。

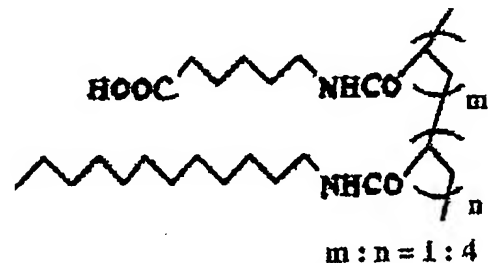
【0031】

【実施例】実施例1：自己支持性ハニカムフィルムの作製

ポリ乳酸（分子量：85,000～160,000）のクロロホルム溶液（10 g/L）、両親媒性高分子Cap（化学構造は以下に示す）のベンゼン溶液（0.4 g/L）、ベンゼンを1：2.5：6.5の割合（体積比）で混合し、キャスト溶液を調製した。直径9 cmのガラスシャーレにMilli-Q水を張り、この水面上にポリ乳酸-Cap溶液40 μ Lを一樣に展開し液滴が拡がらない状態にした。溶媒が蒸発したのを確認した後、同じ溶液50 μ Lを水面上にキャストし、エアポンプで高湿度空気を吹き付けることでハニカムフィルムを得た。水面上に浮いているハニカムフィルムをフレーム（直径5 mm）に移し、自己支持性ハニカムフィルムとした。

【0032】

【化1】



Capの構造式

【0033】実施例2：自己支持性ハニカムフィルム上でのラット肝臓由来肝実質細胞の培養

自己支持性ハニカムフィルム上でラット肝臓由来肝実質細胞（肝細胞）の培養を行った。まず、実施例1で作製した自己支持性ハニカムフィルムの片側に肝細胞を播種し、フィルムへの接着を確認した。次に、その反対側の面にも肝細胞を播種し、培養を行った。培養はWilliams' E培地を用い、CO₂インキュベーター内（CO₂濃度＝5%、温度＝37℃、相対湿度＝80%）で行った。比較例として細孔のないPLLA-両親媒性高分子キャスト膜をフレーム上に設置した自己支持性フィルムの両面に肝実質細胞を播種し、同様の条件で培養を行った。

【0034】実施例1で作製した自己支持性ハニカムフィルムを使用した場合には、フィルムの各面において肝実質細胞が20 μ m程度の厚みを有する立体化した形態を採り、肝臓組織に類似した層状の三次元細胞集合体が形成された。結果を図2に示す。この細胞集合体は高いアルブミン合成能を発現した。一方、細孔のないPLLA-両親媒性高分子キャスト膜をフレーム上に設置した自己

支持性フィルムを使用した場合には、肝細胞は厚さ $5\mu\text{m}$ 程度の著しく扁平化した形態を採り、そのアルブミン分泌能は前者に比較して30%程度であった。

【0035】実施例3：自己支持性ハニカムフィルム上のラット胎児心臓由来心筋細胞の培養

自己支持性ハニカムフィルム上でラット胎児心臓由来心筋細胞（心筋細胞）の培養を行った。まず、実施例1で作製した自己支持性ハニカムフィルムの片側に心筋細胞を播種し、フィルムへの接着を確認した。次に、その反対側の面にも心筋細胞を播種し、培養を行った。培養はF-10培地を用い、 CO_2 インキュベーター内（ CO_2 濃度=5%、温度=37℃、相対湿度=80%）で行った。比較例として細孔のないPLLA-両親媒性高分子キャスト膜をフレーム上に設置した自己支持性フィルムの両面に心筋細胞を播種し、同様の条件で培養を行った。

【0036】実施例1で作製した自己支持性ハニカムフィルムを使用した場合には、フィルムの各面において形成した心筋細胞集合体はその拍動リズムをフィルム全体

で同期させて拍動していた。即ち、フィルムの各面に接着した心筋細胞が多孔質構造を介しても接着している三次元心筋細胞集合体が形成された。一方、細孔のないPLLA-両親媒性高分子キャスト膜をフレーム上に設置した自己支持性フィルムを使用した場合には、心筋細胞はその拍動リズムを同期させることは無かった。

【0037】

【発明の効果】本発明の方法によれば、生体外において生体類似の細胞集合体構造を形成し、さらにその機能の発現を誘導することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ハニカム構造体の延伸の様式を示す図である。

【図2】図2は、ポリ乳酸の自己支持性ハニカム構造体フィルムを培養基材に用いた細胞の三次元培養の概念図（a）、並びに肝実質細胞をポリ乳酸の自己支持性ハニカム構造体フィルムの両面において培養した場合に形成される三次元組織の蛍光顕微鏡写真（b）を示す。

【図1】

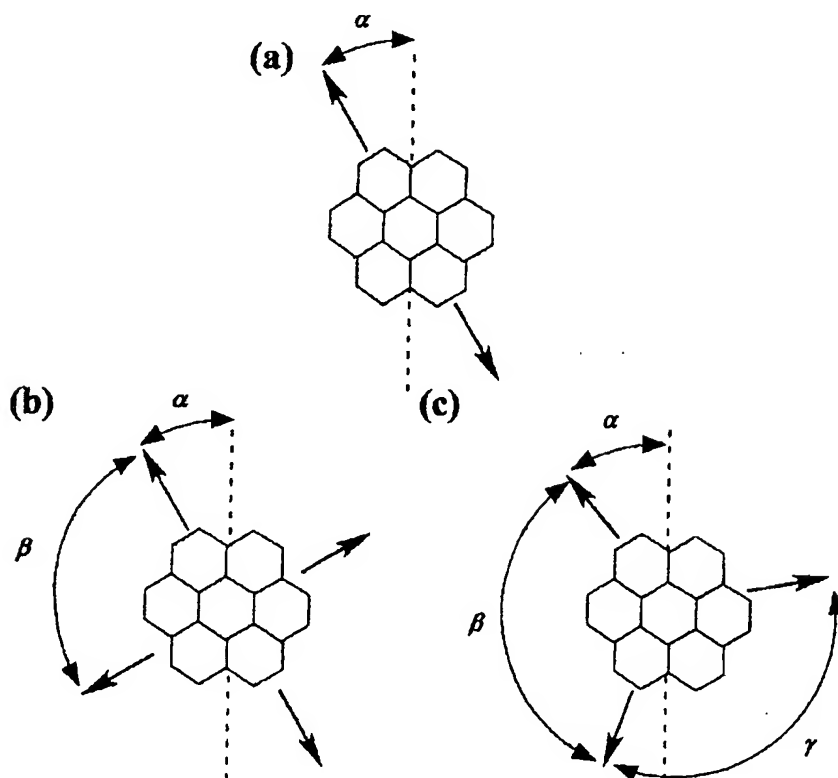


図1 ハニカム構造体の延伸の様式。(a)一軸延伸、(b)二軸延伸、(c)三軸延伸。
 α は対称軸と延伸方向のなす角。 β 、 γ は延伸方向のなす角。

【図2】

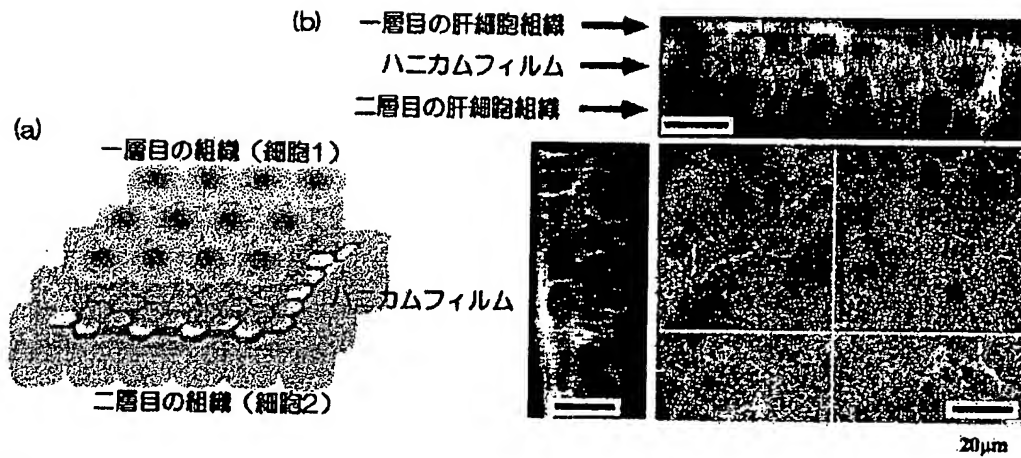


図2 (a) ポリ乳酸の自己支持性ハニカム構造体フィルムを培養基材に用いた細胞の三次元培養
(b) 肝実質細胞をポリ乳酸の自己支持性ハニカム構造体フィルムの両面において培養した場合に形成される三次元組織の蛍光顕微鏡写真

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーム (参考)
/(C08L 67/00		C08L 67/00	
101:00)		101:00	
 (72)発明者 新井 景子			
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所			
内			
F ターム (参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC10 GB09			
GB10			
4B065 AA91X BC41 CA44			
4F074 AA04 AA50E AA50F AA50G			
AA68 AA70 AA76B AA98			
CA01 CA02 CA03 CA04 CB47			
CC02W CC04X CC04Y CC29X			
CC29Y CC46 DA53 DA59			
4F100 AK42A BA01 DC02A EJ37			
EJ38 GB66 GB90 JC00A			
4J002 AD002 AD012 BG122 CF181			
CF191 CG011 CH022 GB00			
GE00			

BEST AVAILABLE COPY